

ХИМИЯ

УДК 544.774.4+547.855.7+535.36

А. В. ПЕТКЕВИЧ, Ж. В. ИГНАТОВИЧ, Е. В. КОРОЛЁВА,
А. Н. ЕРЕМИН, академик В. Е. АГАБЕКОВ

**ОДНОСТАДИЙНЫЙ МЕТОД ФОРМИРОВАНИЯ АССОЦИАТОВ ПРОИЗВОДНЫХ
2-АРИЛАМИНОПИРИМИДИНА С МАГНЕТИТОМ**

Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Беларусь
m_a_w1987@mail.ru; ignatovichz@inbox.ru; evk@basnet.by; yan47@mail.ru; agabekov@ichnm.basnet.by

Разработан одностадийный метод получения ассоциатов наноносителей на основе магнетита с биоактивными соединениями ряда 2-ариламинопириимидина, содержащих фармакофорные фрагменты ингибиторов протеинкиназ и SH-группы. Особенностью метода является присутствие диметилсульфоксида и производных 2-ариламинопириимидина в среде формирования наночастиц магнетита.

Ключевые слова: наночастицы, ассоциаты, магнетит, производные 2-ариламинопириимидина.

A. V. PIETKIEVICH, Zh. V. IGNATOVICH, E. V. KOROLEVA, A. N. ERYOMIN, V. E. AGABEKOV

**ONE-STEP METHOD FOR OBTAINING THE DERIVATIVES OF 2-ARYLAMINOPYRIMIDINE
ASSOCIATES WITH MAGNETITE**

Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
m_a_w1987@mail.ru; ignatovichz@inbox.ru; evk@basnet.by; yan47@mail.ru; agabekov@ichnm.basnet.by

A one-step method for preparing associates of magnetite nanocarriers with bioactive 2-arylaminopyrimidine derivatives containing the pharmacophore fragments of protein kinase inhibitors and SH-group was developed. The feature of the method is the presence of dimethyl sulfoxide and 2-arylaminopyrimidines in the medium of formation of magnetite nanoparticles.

Keywords: nanoparticles, associates, magnetite, derivatives of 2-arylaminopyrimidine.

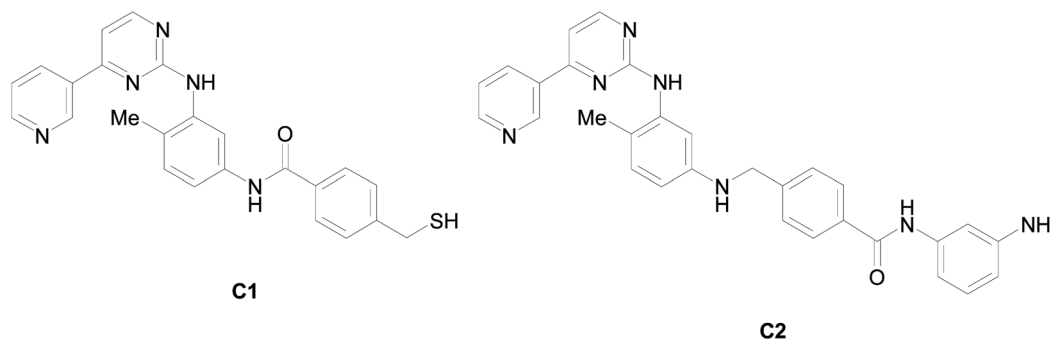
Введение. Разработка методов и средств целевой доставки лекарственных препаратов к органам и тканям особенно актуальна в терапии онкологических заболеваний, так как токсичность используемых лекарств часто является препятствием для эффективного лечения. Применение наночастиц (НЧ) для целевой доставки лекарств позволяет повысить качество лечения, обеспечивая биодоступность плохо растворимых соединений и их контролируемое высвобождение в органах-мишенях. Имобилизованные на НЧ терапевтические агенты в большей степени защищены от химической и биологической деградации, чем свободные [1; 2].

На основе синтетических производных 2-аминопириимидина разработаны ингибиторы протеинкиназ для терапии хронического миелолейкоза, опухолей легких, мозга, неоперабельных и/или метастатических стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта [3]. Нами синтезированы новые арил(гетарил)аминометилбензамида, содержащие в структуре как фармакофорные фрагменты ингибиторов протеинкиназ, так и функциональные группы, обеспечивающие хемосорбцию этих соединений на наносорбентах [4–6].

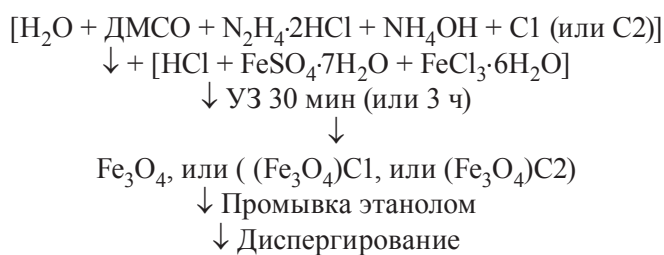
НЧ оксидов железа могут быть использованы в целевой доставке лекарственных веществ, так как имеют насыщенную гидроксильными группами поверхность, на которой сравнительно легко можно хемосорбировать органические соединения [7; 8]. В зависимости от pH среды Fe-OH центры могут реагировать с ионами H^+ или OH^- , создавая на поверхности положительный ($Fe-OH_2^+$) или отрицательный ($Fe-O^-$) заряд [8].

Цель исследования – разработка одностадийного способа получения ассоциатов НЧ магнетита с производными 2-ариламинопиридина и характеристика их гидродинамических свойств в среде, близкой к нейтральной.

Материалы и методы исследования. В работе использовали гидразин дигидрохлорид (Sigma-Aldrich, Испания), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Alfa Aesar, Германия), поливинилпирролидон (Sigma-Aldrich, США) и синтезированные нами 4-(меркаптометил)-N-[4-метил-3{4-(пиридин-3-ил)пиридин-2-иламино}фенил]бензамид C1 [4] и N-[(3-аминофенил)]-4-{4-метил-3-[(4-пиридин-3-ил)пиридин-2-иламино]фенил}амино]метил} бензамид C2 [6]:



Синтез магнетита и формирование его ассоциатов с соединениями C1, C2 проводили по схеме:



Готовили два охлажденных до 5–8 °С раствора: первый содержал 0,04 Н HCl, 150 мМ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и 300 мМ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, второй – 11,1 об. % ДМСО, 100 мМ $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot 2\text{HCl}$, 2,222 М NH_4OH и C1 или C2. К 1,80 мл раствора 2 добавляли 0,20 мл раствора 1 и полученный золь обрабатывали УЗ (Elmasonic S 30Н, Германия) в течение 30 мин (для получения ассоциата) или 3 ч (для получения магнетита) в условиях роста температуры до 24–25 °С или до 61–65 °С соответственно. Золь центрифугировали (5000 об/мин, 5 мин, 5 °С), супернатант удаляли, а осадок промывали этанолом и диспергировали в водном растворе 0,1 мг/мл ПВП (поливинилпирролидона) или в дистиллированной воде.

Размер и форму частиц оценивали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), используя микроскоп JEM–100CX (Япония). Гидродинамические характеристики частиц определяли методом динамического лазерного рассеяния света на анализаторе ZetaSizer Nano-ZS (Malvern, Великобритания), используя золи как в среде их получения, так и после очистки частиц и диспергирования их в дистиллированной воде или 0,1 мг/мл водном растворе ПВП. При проведении измерений золи разводили дистиллированной водой.

Результаты и их обсуждение. Золь магнетита имеет pH 9,0 и содержит частицы с размером <20 нм (рис. 1). При его 50-кратном разведении средний гидродинамический диаметр частиц составляет 699 нм, т. е. существенно больший, чем размер частиц, определенный методом ПЭМ (рис. 1).

Ввиду того, что C1 и C2 мало растворимы в воде в среду синтеза добавляли ДМСО, который применяется в медицине как местное противовоспалительное и обезболивающее средство. Время осаждения частиц магнетита в поле постоянного магнита (~85 мТл) увеличивается с ростом концентрации ДМСО в среде синтеза: в отсутствие ДМСО и при его содержании 10 об. % магнетит осаждается за 11 с, а в среде с 30 об. % ДМСО – за 15 с. Агломераты магнетита, сформиро-

ванные без ДМСО, при разведении золя дис- тиллированной водой диспергируют эффектив- нее, чем полученные в среде с ДМСО (табл. 1). Так, в первом случае при 40-кратном разведе- нии золя магнетита средний гидродинами- ческий диаметр агломератов равен 840 нм, а во втором – 1100–1200 нм (табл. 1). С разве- дением золя магнетита, сформированного в сре- де с 10–30 об. % ДМСО, поверхность частиц перезаряжается: при 40-кратном разведении дзета-потенциал отрицательный, а при 100-крат- ном – положительный (табл. 1). Наиболее су- щественные изменения дзета-потенциала на- блюдаются в присутствии 10 об. % ДМСО.

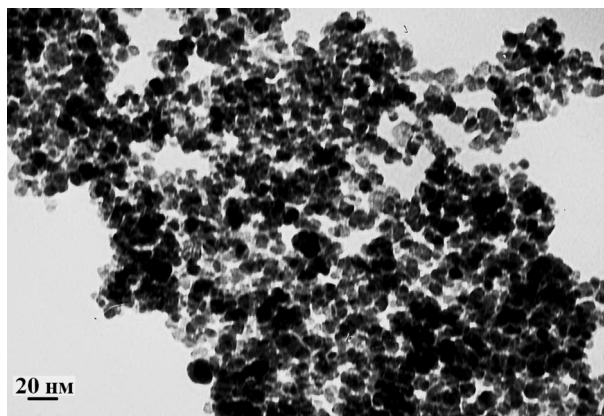


Рис. 1. ПЭМ изображение НЧ магнетита

Т а б л и ц а 1. Гидродинамические характеристики золей магнетита в реакционной среде, содержащей различные концентрации ДМСО

ДМСО, %	Разведение золя дис- тиллированной водой, раз	Диаметр частиц, нм	Дзета-потенциал, мВ	Удельная проводимость, мСм/см
0	20	1251		
	40	838	–0,03	0,549
	100	919	–8,58	0,239
10	20	1575		
	40	1053	–5,37	0,707
	100	1026	23,80	0,153
20	20	1316		
	40	1155	–8,33	0,981
	100	1071	6,51	0,486
30	20	2015		
	40	1102	–6,04	0,783
	100	796	5,39	0,267

Дзета-потенциал очищенного магнетита в водном растворе ПВП равен –5,9 и –11,5 мВ (рис. 2, а), а в дистиллированной воде – –27,1 и –18,3 мВ при 40- и 100-кратном разведении золей соответственно. Известно, что ПВП проявляет катионактивные свойства и способен формиро- вать комплексы с анионными полимерами [9]. Уменьшение дзета-потенциала указывает на свя- зывание ПВП с Fe-O^- центрами на поверхности магнетита.

Дзета-потенциал ассоциатов $(\text{Fe}_3\text{O}_4)\text{C1}$, образованных в присутствии разных концентраций С1, во всех случаях положительный (рис. 2, а, зависимости 1 и 2). Изменение знака дзета-потен- циала магнетита в присутствии С1 свидетельствует о связывании частиц магнетита с С1 путем как ковалентного взаимодействия с SH -группой, так и образованием водородных связей с други- ми фрагментами молекулы.

Связываясь с магнетитом, С1 не только изменяет его дзета-потенциал, но и влияет на агломе- рацию частиц. В наибольшей степени агрегирует ассоциат $(\text{Fe}_3\text{O}_4)\text{C1}$, полученный в среде, со- держащей 0,05 и 0,3 мМ раствор С1 (рис. 3, зависимости 2 и 5). Агломерация $(\text{Fe}_3\text{O}_4)\text{C1}$, получен- ного в среде 0,05 мМ С1, по-видимому, обусловлена преимущественным включением его в по- ристую структуру агломератов магнетита. Насыщение внутреннего пространства агломератов достигается в среде 0,1 мМ С1 (рис. 2, а, кривая 1), а с ростом его концентрации функцинализи- руется поверхность агломератов. Между ассоциатом $(\text{Fe}_3\text{O}_4)\text{C1}$ и ПВП возможен обмен молеку- лами С1 с образованием комплексов $(\text{Fe}_3\text{O}_4)\text{C1-PVP}$, PVP-C1 . Известно, что ПВП эффективно адсорбирует токсины, красители, лекарственные вещества и образует комплексы с сульфатаизо- лом, новокаином, пенициллином, тетрациклином [9].

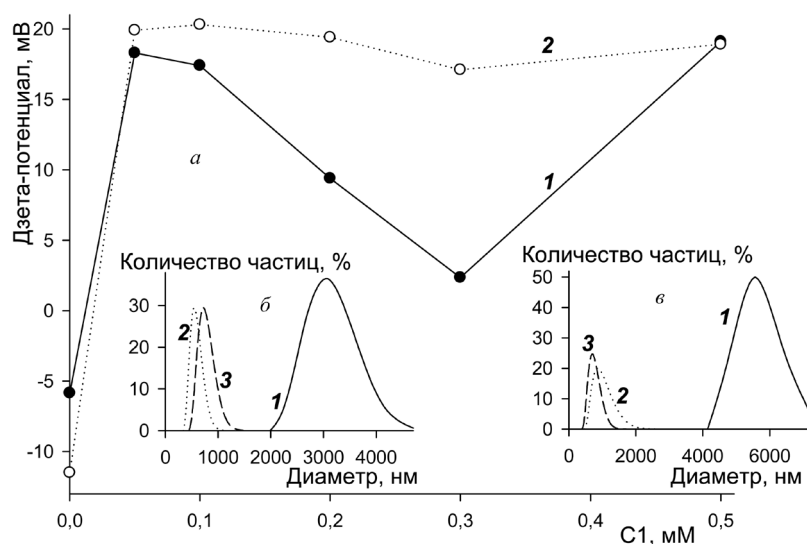


Рис. 2. Зависимость величины дзета-потенциала ассоциата (Fe_3O_4)C1 от концентрации C1 в среде его получения (а) (золи в водном растворе 0,1 мг/мл ПВП разведены в 40 (1) и 100 (2) раз); распределение количества частиц в зависимости от их гидродинамического диаметра для магнетита (б) и ассоциата (Fe_3O_4)C1 (в), полученного в среде с 0,05 мМ C1 (концентрированный золь (1), разведенный в 40 (2) и 100 (3) раз)

По мере десорбции C1 с поверхности (Fe_3O_4)C1 уменьшается дзета-потенциал ассоциата, достигая минимальной величины в случае 0,3 мМ C1 (рис. 2, а, кривая 1). Из-за малой величины поверхностного заряда возрастает агрегация (Fe_3O_4)C1 (рис. 3, зависимость 5). В случае 0,5 мМ C1 обеспечивается насыщение как ПВП, так и агрегатов магнетита. Сравнительно высокая величина и незначительное изменение дзета-потенциала при разведении золя (Fe_3O_4)C1 в 100 раз (рис. 2, а, кривая 2) отражает большее сродство C1 к магнетиту, чем к ПВП.

В наиболее устойчивой конформации по данным расчетов методом MM2 (программа Chem.3D.Ultra 9.0) молекула C1 имеет планарную структуру ариламинопиримидинового фрагмента амида, вне плоскости находится лишь меркаптометилфенильный заместитель (рис. 4). По-видимому, характер связывания C1 с поверхностью частиц магнетита зависит от его концентрации в растворе. При большем содержании C1 уменьшается число водородных связей с магнетитом, что облегчает десорбцию C1 в среде с ПВП и стимулирует образование комплекса ПВП–C1.

В отличие от (Fe_3O_4)C1, ассоциаты (Fe_3O_4)C2 были диспергированы в дистиллированной воде. Незначительная величина проводимости золь (табл. 2) свидетельствует об отсутствии не связанных с частицами ионных компонентов среды синтеза. Магнетит в водной среде агрегирует

в большей степени (табл. 2, рис. 5, зависимости 1 и 2), чем ассоциат (Fe_3O_4)C2, сформированный в среде 0,3 мМ C2 (рис. 5, распределения 3 и 4). При содержании C2, равном 0,45 мМ,

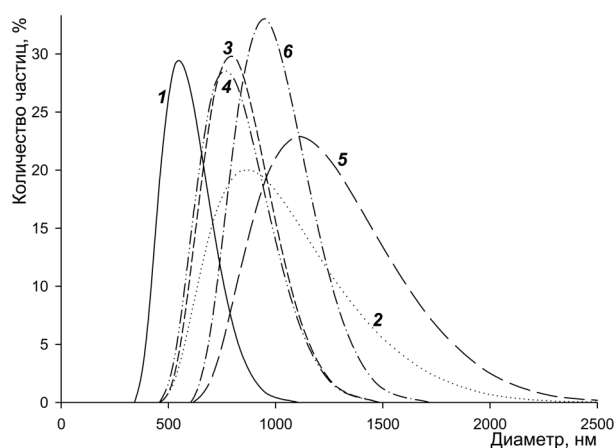


Рис. 3. Распределение количества частиц в зависимости от их гидродинамического диаметра магнетита (1) и ассоциата (Fe_3O_4)C1 (2–6): золи получены в среде, содержащей 0 (1), 0,05 (2), 0,1 (3), 0,2 (4), 0,3 (5) и 0,5 (6) мМ C1 и разведены дистиллированной водой в 40 раз

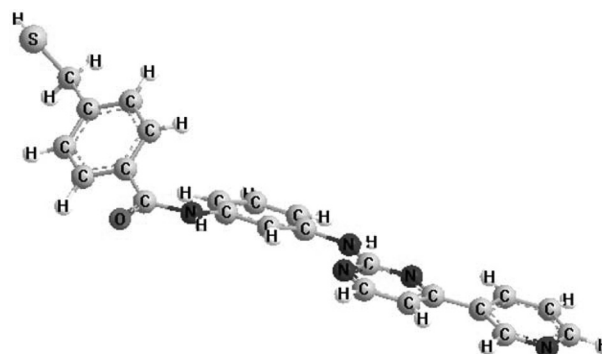


Рис. 4. 3D модель пространственной структуры C1

Т а б л и ц а 2. Гидродинамические характеристики частиц магнетита и ассоциата $(\text{Fe}_3\text{O}_4)\text{C}2$ в дистиллированной воде

Образец	Разведение, раз	Диаметр частиц, нм	PdI	Дзета-потенциал, мВ	Удельная проводимость, мСм/см
Fe_3O_4	20	889	0,947		
	40	1215	0,112	-27,1	0,076
	100	868	0,088	-18,3	0,027
$(\text{Fe}_3\text{O}_4)\text{C}2$ (0,30 мМ C2)	20	575	0,282		
	40	365	0,193	-21,6	0,053
	100	373	0,211	-13,2	0,016
$(\text{Fe}_3\text{O}_4)\text{C}2$ (0,45 мМ C2)	20	455	0,264		
	40	474	0,267	-27,8	0,042
	100	558	0,310	-14,4	0,016

агломерация ассоциата $(\text{Fe}_3\text{O}_4)\text{C}2$ увеличивается (табл. 2), однако ее степень меньше (рис. 5, зависимости 3 и 4), чем у Fe_3O_4 (рис. 5, зависимости 1 и 2) и $(\text{Fe}_3\text{O}_4)\text{C}1$ (рис. 3, зависимость 6). При 40-кратном разведении в максимальном количестве представлены частицы $(\text{Fe}_3\text{O}_4)\text{C}1$ с гидродинамическим диаметром 1201 нм (рис. 3, зависимость 5), а в случае $(\text{Fe}_3\text{O}_4)\text{C}2$ – 295 нм. Следовательно, C2 проявляет большую антиагрегативную способность, чем C1.

Дзета-потенциал как золя магнетита, так и ассоциата $(\text{Fe}_3\text{O}_4)\text{C}2$ уменьшается при разведении дистиллированной водой (табл. 2), что указывает на десорбцию потенциалопределяющих соединений с поверхности наночастиц. В присутствии C1 и ПВП этот процесс не наблюдается (рис. 2, а, кривая 2), что возможно обусловлено более слабым взаимодействием аминогрупп с поверхностью частиц, чем SH-групп.

Заключение. Производные 2-ариламинопиримидина, содержащие SH- и H_2N -группы, способны связываться с магнетитом в процессе его синтеза с образованием ассоциатов. Эффективность ассоциации зависит от их взаимодействия с полимерным коллоидным стабилизатором и концентрации в среде, что отражают гидродинамические характеристики ассоциатов. Производное C2, содержащее концевую NH_2 -группу, проявляет большую диспергирующую активность, чем C1, имеющее доступную SH-группу.

Список использованной литературы

1. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy / G. Chen [et al.] // Chem. Rev. – 2016 – Vol. 116. N 5. – P. 2826–2885.
2. Thanh, N. T. K. Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications / N. T. K. Thanh, L. A. W. Green // Nano Today. – 2010 – Vol. 5, N 3. – P. 213–230.
3. Производные аминопиримидина как ингибиторы протеинкиназ. Молекулярный дизайн, синтез и биологическая активность / Е. В. Королева [и др.] // Журн. орган. химии. – 2016 – Т. 52, № 2. – С. 159–196.
4. Получение и свойства ассоциатов наночастиц золота с 4-(меркаптометил)-N-[4-метил-3{4-(пиридин-3-ил)-пиримидин-2-иламино}фенил] бензамидом / А. В. Абакшонок [и др.] // Докл. НАН Беларуси. – 2013. – Т. 57, № 6. – С. 52–56.
5. Ассоциация амидов 2-ариламинопиримидина и фолиевой кислоты с композитными наночастицами на основе сульфида цинка и магнетита / А. В. Абакшонок [и др.] // Весті НАН Беларусі. Сер. хім. навук. – 2015. – № 2. – С. 72–81.
6. Synthesis of N-[2(3,4)-aminophenyl]-4-({4-methyl-3-[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-ylamino]phenyl}aminomethyl)-benzamides / Zh. V. Ignatovich [et al.] // Russ. J. Org. Chem. – 2015. – Vol. 51, N 10. – P. 1449–1452.
7. Resolving the Structure of Ligands Bound to the Surface of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles by High-Resolution Magic-Angle Spinning NMR Spectroscopy / L. Polito [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2008. – Vol. 130, N 38. – P. 12712–12724.
8. Illés, E. The effect of humic acid adsorption on pH-dependent surface charging and aggregation of magnetite nanoparticles / E. Illés, E. Tombácz // J. Colloid and Interface Science. – 2006. – Vol. 295, N 1. – P. 115–123.
9. Сидельковская, Ф. П. Химия N-винилпирролидона и его полимеров / Ф. П. Сидельковская. – М.: Наука, 1970. – 150 с.

Поступило в редакцию 28.06.2016

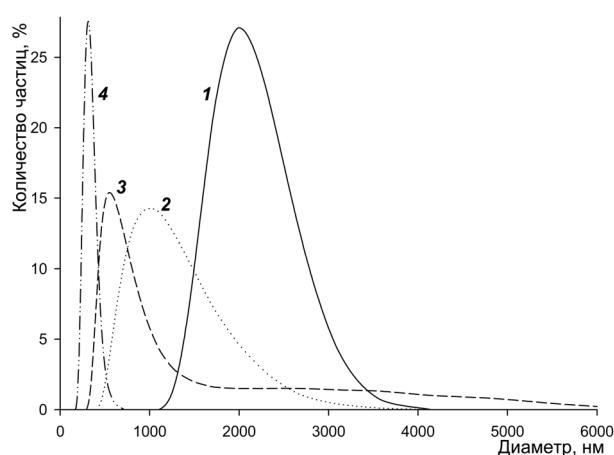


Рис. 5. Распределение количества частиц в зависимости от их гидродинамического диаметра магнетита (1, 2) и ассоциата $(\text{Fe}_3\text{O}_4)\text{C}2$ (3, 4): 1 и 3 – исходный золь, 2 и 4 – разведенный дистиллированной водой в 40 раз